

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-49689

(43)公開日 平成5年(1993)3月2日

(51)IntCl⁵

A61L 25/00

C08J 7/00

// C12N 5/06

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

Z 7038-4C

7258-4F

審査請求 未請求 請求項の数2(全10頁)

(21)出願番号 特願平3-259550

(22)出願日 平成3年(1991)8月20日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成3年6月23日
エルスヴィア・サイエンス・パブリッシャーズ・ビー・
ブイ発行の「第6回インターナショナル・コンファレン
スラジエーション・エフエクト・イン・インシュレータ
ーズ」に発表

(71)出願人 000002185

ソニー株式会社

東京都品川区北品川6丁目7番35号

(71)出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢2番1号

(72)発明者 鈴木 嘉昭

東京都品川区北品川6丁目7番35号 ソニ
ー株式会社内

(72)発明者 日下部 正宏

東京都品川区北品川6丁目7番35号 ソニ
ー株式会社内

(74)代理人 弁理士 小池 晃 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞接着性材料およびその製造方法

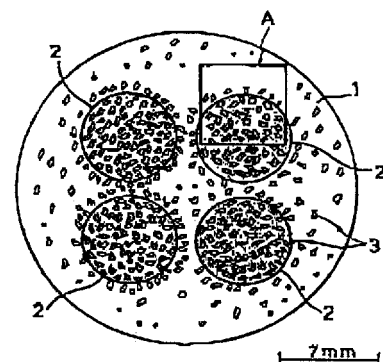
(57)【要約】

【目的】 高分子材料表面の細胞接着性を向上させ、ま
たは新たに付与する。

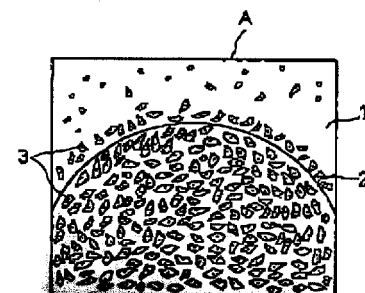
【構成】 ポリスチレン(P S)製シャーレの底面にド
ース量 $1 \times 10^{15} \sim 3 \times 10^{17}$ 個/cm²の範囲で
N⁺, Na⁺, N₂⁺, O₂⁺, K⁺等のイオンを注
入した後、ウシ胸部血管内皮細胞を培養した。いずれの
イオンを用いた場合にも、イオン照射面2上ではイオン
未照射面1上に比べて多くの細胞3が粘着していた。セ
グメント化ポリウレタン(S P U)のフィルムを貼付し
たシャーレを用いた場合には、イオン未照射面上にはほ
んど細胞が付着しないが、イオン照射面上において選
択的に細胞が粘着した。赤外線吸収分光法、ラマン分光
法により表面構造の変化を明らかにした。

【効果】 細胞培養用シャーレ、ハイブリッド型医療材
料等として有望である。

(a)



(b)



【特許請求の範囲】

【請求項1】 炭素を構成元素として含む高分子材料より構成され、表面の少なくとも一部がイオン衝撃により改質されてなる細胞接着性材料。

【請求項2】 炭素を構成元素として含む高分子材料の表面の少なくとも一部にドーズ量 ϕ が $1 \times 10^{15} \leq \phi < 1 \times 10^{18}$ 個/cm² となる範囲でイオン注入を行うことを特徴とする細胞接着性材料の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は細胞培養容器もしくは各種医療用材料として使用可能な細胞接着性材料およびその製造方法に関し、特に細胞の接着性を向上させた材料、および接着性を向上させる方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、皮膚、粘膜、血管、肝臓、脾臓等、人工材料のみでは機能の代替が不十分である臓器について、細胞組み込み型のハイブリッド人工臓器を目指す動きが活発化している。この場合、培養される細胞の足場となるマトリクスの材料を選択、設計することが重要な課題となる。たとえば、内皮細胞の付着、成長、分化が細胞の固定状態に依存することは良く知られている。マトリクスは一般に高分子材料から構成されているが、この高分子材料の表面を種々の手法で改質することが従来より行われている。

【0003】 表面改質の方法は、プラズマ処理、放電処理等に代表される乾式処理と、コーティング、グラフト化等に代表される湿式処理とに大別される。たとえば、上記プラズマ処理としては、アルゴン等の不活性イオンのスパッタリング作用を利用する非反応性プラズマ処理や、酸素、水蒸気等の反応性ガスを用いた反応性プラズマ処理が行われている。いずれもイオン入射エネルギーは数keV程度であり、高分子材料の表面を粗面化して細胞の付着性や水に対する接触角を変化させたり、あるいは $>C=O$ 基や $-C-O-$ 結合等の極性構造部を導入して親水性を付与することができる。

【0004】 またコーティングとしては、たとえばマトリクス表面に結合組織由来のコラーゲン、フィブロネクチン等の接着性タンパク質の溶液をプレコートし、内皮細胞、繊維芽細胞等の接着性を向上させることが行われている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、従来の技術には解決すべき課題も残されている。まず、プラズマ処理を行うと高分子材料の表面が粗面化されるが、これは一般に細胞の付着を促進する反面、増殖を抑制する傾向がある。また、プラズマの状態は装置ごとに異なっているので、処理条件の統一化は実質的に不可能であり、制御性、再現性の向上を望むことはできない。

【0006】 一方のコーティングには、細胞が接着性タ

ンパク質の層を介してマトリクスに結合しているため、マトリクスと細胞間の接着力が比較的弱いという問題がある。そこで本発明は、細胞の接着性および増殖性に優れる細胞接着性材料、およびその制御性、再現性に優れた製造方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上述の目的を達成するために鋭意検討を行った結果、細胞接着性材料の表面がイオン衝撃により改質された場合に顕著な接着性と増殖性の向上がみられること、および上記の改質を行うためには所定のドーズ量範囲内でイオン注入を行うことが有効であることを見出した。イオン注入による高分子材料の表面改質については、たとえばMat. Res. Soc. Symp., Vol. 110, p. 669 (1989)、あるいは特開平3-112560号公報等において、シリコン樹脂に H^+ 、 O_2^- 、 N_2^+ 等のイオン注入が施されてなる抗血栓性材料が開示されている。本発明では、このイオン注入技術を細胞接着性材料の表面改質に適用するわけである。

【0008】 すなわち本願の第1の発明にかかる細胞接着性材料は、炭素を構成元素として含む高分子材料より構成され、表面の少なくとも一部がイオン衝撃により改質されてなることを特徴とする。

【0009】 本願の第2の発明にかかる細胞接着性材料の製造方法は、炭素を構成元素として含む高分子材料の表面の少なくとも一部にドーズ量 ϕ が $1 \times 10^{15} \leq \phi < 1 \times 10^{18}$ 個/cm² となる範囲でイオン注入を行うことを特徴とする。

【0010】 本発明で使用される炭素を構成元素として有する高分子材料は、ポリスチレン、ポリウレタン等のように炭素系の主鎖を有するいわゆる有機高分子材料であっても、あるいはシロキサン($Si-O$ 結合)を主鎖とし、側鎖に炭化水素基等を有するシリコン樹脂等であっても良い。注入するイオン種としては He^+ 、 C^+ 、 N^+ 、 Ne^+ 、 Na^+ 、 N_2^+ 、 O_2^+ 、 Kr^+ 等が例示されるが、溶出して細胞の育成を阻害するものでなければこれらに特に限定されるものではない。

【0011】 ドーズ量 ϕ は、 $1 \times 10^{15} \leq \phi < 1 \times 10^{18}$ 個/cm² の範囲に選ばれる。 10^{14} 個/cm² のオーダーでは細胞接着性に顕著な改善効果がみられず、 10^{18} 個/cm² のオーダーでは処理時間が大幅に延長するものの細胞接着性の改善効果は飽和する。イオン加速エネルギーに関しては、その高低によりエネルギー伝達機構に差異が生ずるものと考えられるが、実用的には数十〜数百keV程度の範囲で設定すれば良い。

【0012】 ビーム電流密度はおおよそ $0.5 \mu A/cm^2$ を越えない範囲に設定する。これは、ビーム電流密度が過大になるとターゲットである高分子材料の温度が上がり過ぎ、高分子材料自身が劣化する上、細胞の接着性が低下する虞れがあるからである。

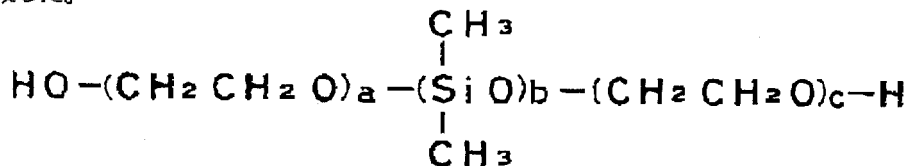
【0013】

【作用】高分子材料の構造と細胞接着性との関連性は必ずしも明確にはされていないが、本願の第1の発明にかかる細胞接着性材料においては、イオン衝撃により生ずる各種官能基の導入、これらによる表面電荷密度の変化等が細胞接着性の向上に重要な役割を果たしているものと推測される。また炭素構造に関しては、異なる高分子材料を用いた場合にも類似したアモルファス化がみられる。

【0014】本願の第2の発明では、上述のイオン衝撃を与える手段としてイオン注入を提案する。イオン注入は、その反応自体がイオン・ビームと被注入材料（ターゲット材料）との間の相互作用に限られる。しかも、イオン入射エネルギーを選択することにより表面から任意に深さイオンを埋め込むことができ、極めて制御性に優れている。これは、プラズマ処理にはない特徴である。注入されたイオンは、比較的质量の軽いイオンに対しては拡散初期に電子阻止能が働き、比較的质量の重いイオンに対しては始めから核阻止能が働くという機構上の差異はあるものの、高分子材料に格子振動による加熱をもたらす（熱的非平衡状態）、溶融、アモルファス化等を引き起こす。

【0015】

【実施例】以下、本発明を具体的な実験結果にもとづいて説明する。本実験では、ポリスチレン（PS）製シャーレ、および底面にセグメント化ポリウレタン（SPU）フィルムを貼付したガラス製シャーレに所定のマスク・パターンを介して He^+ 、 N^+ 、 Ne^+ 、 Na^+ 、 N_2^+ の各イオン・ビームを用いてイオン注入を行い、これらのシャーレ内でウシ胸部大動脈由来の血管内皮細胞を培養してビーム照射部とビーム未照射部との間で細胞の増殖性を比較した。



Mn 2400

(a+c):b=0.68:0.32

SPUは、成膜条件により化学構造の異なる幾つかのタイプのものが得られるが、ここでは、ジオキサンとN,N-ジメチルアセトアミドの7:3混合溶液に溶解して適当な基材上に塗布した後フィルム状に乾燥させた、いわゆるドライタイプのものを使用した。

【0022】表面分析

イオン注入による構造破壊および新たなラジカル形成は、フーリエ変換赤外分光全反射法（FT-IR-AT

【0016】まず、基本的な実験条件について説明する。

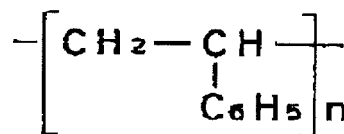
【0017】イオン注入

He^+ 、 N^+ 、 Ne^+ 、 Na^+ 、 N_2^+ 、 O_2^+ 、 Kr^+ の各イオンを、室温下で加速エネルギー150keV、ドーズ量 $1 \times 10^{15} \sim 3 \times 10^{17}$ 個/cm²、ビーム電流密度0.5μA/cm²以下の条件で注入した。

【0018】試料ポリスチレン（PS）製シャーレは、Becton Dickinson社製、商品名FALCON1008を使用した。ポリスチレンの化学構造式は、化1で示されるとおりである。

【0019】

【化1】



【0020】セグメント化ポリウレタン（SPU）は、人工心臓の内部コーティング材料として実用化されているものである。今回使用した材料は鍾ガ淵化学工業社から提供を受けた材料であり、ソフトセグメントがポリテトラメチレンオキシド（分子量2000）とポリジメチルシロキサン化合物（分子量2400）とからなり、ハードセグメントが4,4-ジフェニルメタンジイソシアネートとエチレングリコールからなるものである。ここで、上記ポリジメチルシロキサン化合物は、化2に示されるように、主鎖の両末端にポリエチレンオキシドが結合されてなるものである。

【0021】

【化2】

R法）により測定した。使用した装置はBiorad Digilab社製のフーリエ変換赤外線分光装置、型式名FTS-15E/Dである。

【0023】また、炭素間多重結合の伸縮振動の検出は、ラマン分光法により行った。使用した装置はJobin Yvon社製のラマン分光装置、型式名RamanorU-1000であり、室温にてアルゴン・レーザ（5145Å）の散乱を測定した。上記装置はダブル・

ビーム型であり、差スペクトルの測定が可能である。

【0024】血管内皮細胞の単離

Jaffeらの方法[J. Clin. Invest., 52, (1973), 2645]およびSchwartzの方法[In Vitro, 14, (1978) 966]を若干改良した方法により、ウシ胸部下行大動脈から内皮細胞を単離した。

【0025】血管内皮細胞の培養方法

ウシ胎児血清10%を添加した培養液(ニッスイ薬品社製, RPMI-1640)に、1ml当たりの細胞数が2~ 2.5×10^4 個となるよう血管内皮細胞を懸濁させた。この懸濁液をイオン注入を行ったシャーレに注入し、CO₂濃度5%のインキュベータ内雰囲気下で2~7日間培養した。

【0026】所定の日数が経過した後の細胞の接着および増殖状態は、位相差対物レンズを搭載した光学顕微鏡にて目視観察した。

【0027】以下、実際の細胞培養結果について説明する。

実験例1

本実施例では、予備的な実験として、直径3.3mmのPS製シャーレの底面中央にアルミニウム・マスクを介して20mm四方の正方形パターンにNa⁺をドーズ量 1×10^{15} 個/cm²にてイオン注入した。このとき、イオン・ビームの照射部は褐色に着色した。

【0028】このPS製シャーレに濃度 2×10^4 個/1mlの血管内皮細胞の懸濁液を注入し、培養日数と細胞数の変化との関係を調べた。比較のために、イオン注入を行っていない未照射のPS製シャーレについても同様の実験を行った。結果を図1に示す。図中、縦軸は細胞数(個)、横軸は培養日数(日)であり、実線のグラフは未照射のPS製シャーレ、破線のグラフはNa⁺照射を行ったPS製シャーレを使用した場合に対応している。この結果より、培養開始後4日目以降から、Na⁺照射を行ったシャーレ上での細胞数が、未照射のシャーレ上での細胞数を顕著に上回った。これにより、イオン注入の有効性を確認した。

【0029】実験例2

本実験例では、7mm径の円形パターンを4個開口したアルミニウム・マスクを介してPS製シャーレの底面にN₂⁺をドーズ量 1×10^{15} 個/cm²にてイオン注入し、このシャーレ上で血管内皮細胞(以下、単に細胞と称する。)を培養した。

【0030】3日後の状態を顕微鏡観察にもとづいてスケッチした図を図2に示す。図2(a)はPS製シャーレの全体像、図2(b)は図2(a)中の領域Aを拡大したものである。4個の円形のイオン照射面2上では細胞3がほぼ全面に接着しているが、イオン未照射面1上では接着している細胞3の個数は少なく、イオン注入により細胞接着性が向上したことが明らかである。さらに

詳細に観察すると、イオン照射面2の周辺部にも細胞3が局在しており、イオン照射面2上に接着した細胞3が他の細胞3の接着を促進していることがわかる。また、イオン未照射面1上に接着した細胞3は概して円形の形状を示しているのに対し、イオン照射面2上に接着した細胞3は偽足を伸ばしており、接着性が良好である状態を示していた。

【0031】この他、He⁺, Ne⁺, O₂⁺, Kr⁺をそれぞれドーズ量 $1 \times 10^{15} \sim 3 \times 10^{17}$ 個/cm²の範囲でイオン注入し、同様に細胞培養を行った場合にも、ほぼ同様の結果が得られた。

【0032】ここで、Na⁺, N₂⁺, O₂⁺, Kr⁺の各イオンをそれぞれドーズ量 1×10^{17} 個/cm²にてイオン注入したPS製シャーレのイオン照射面をFT-IR-ATR法により分析した結果を図3に示す。比較のために、イオン注入を行っていないサンプルの測定結果も、未照射PSとして併記した。イオン注入により生成した新たな構造としては、>C=O基(1700cm⁻¹)、縮合環(1400~1600cm⁻¹)、C-C結合およびC-O結合(1000~1200cm⁻¹)、-OH基(3400cm⁻¹)等がある。これらの吸収ピーク面積を、どのサンプルにも安定して現れているCH₂(1460cm⁻¹)のピーク面積で規格化したところ、イオン種ごとの異なった効果が明らかとなった。たとえば、Na⁺は縮合環の生成に、またN₂⁺は-OH基の生成にそれぞれ顕著な効果があった。

【0033】また、芳香環の分解率を調べるために、芳香族炭化水素(3000~3120cm⁻¹)の吸収ピーク面積を脂肪族炭化水素(2800~3000cm⁻¹)の吸収ピーク面積で割った値を比較した。この結果、イオン質量と分解率との間に明確な相関はみられなかったが、これら4種類のイオンの中ではNa⁺の効果が最大であった。

【0034】さらに、上記サンプルのラマン散乱スペクトルを図4に示す。いずれのイオン種を用いた場合にも、ほぼ1500cm⁻¹付近を中心とし、短波長側に肩を有する非対称なピークを示した。この肩のうち1330cm⁻¹付近のものは、不規則なグラフアイト状のsp²炭素に対応する。また1480cm⁻¹付近のものは、sp¹炭素、sp²炭素、sp³炭素が混在するアモルファス状態に対応している。

【0035】実験例3

本実験例では、0.01mm径の円形パターンを多数開口したメッシュ状のアルミニウム・マスクを介してPS製シャーレの底面にN⁺をドーズ量 1×10^{15} 個/cm²にてイオン注入し、このシャーレ上で細胞を培養した。2日後の状態を顕微鏡観察にもとづいて一部スケッチした図を図5に示す。図中、前述の図2と共通部分については同一符号を付してある。本実験においても、円形のイオン照射面2a上にはその周囲のイオン未照射面

1上におけるよりも細胞3が優位に接着していた。

【0036】実験例4

本実験例では、底面にSPUフィルムを貼付したガラス製シャーレ（以下、SPUシャーレと称する。）の該底面に、7mm径の円形パターンを4個開口したアルミニウム・マスクを介して Na^+ をドーズ量 3×10^{17} 個/ cm^2 にてイオン注入し、このSPUシャーレ上で細胞を培養した。

【0037】2日後の状態を顕微鏡観察にもとづいてスケッチした図を図6に示す。図6(a)はSPUシャーレの全体像、図6(b)は図6(a)中の領域Bを拡大したものである。SPUは元来、細胞接着性の低い材料であり、イオン未照射面11上には細胞3はほとんど接着していない。しかし、4個の円形のイオン照射面12上では、培養開始後2日目にして細胞3がほぼ全面に接着した。

【0038】この他、 He^+ 、 Ne^+ 、 O_2^+ 、 Kr^+ をそれぞれドーズ量 $1 \times 10^{15} \sim 3 \times 10^{17}$ 個/ cm^2 の範囲でイオン注入し、同様に細胞培養を行った場合にも、ほぼ同様の結果が得られた。

【0039】ここで、 Na^+ 、 O_2^+ 、 Kr^+ の各イオンをそれぞれドーズ量 1×10^{17} 個/ cm^2 にてイオン注入した場合のイオン照射面をFT-IR-ATR法により分析した結果を図7に示す。比較のために、イオン注入を行っていないサンプルの測定結果も、未照射SPUとして併記した。イオン注入により生成した新たな構造としては、 $-\text{OH}$ 基(3400cm^{-1})、 $>\text{C}=\text{O}$ 基(1700cm^{-1})、アモルファス炭素(1600cm^{-1})、 $\text{C}-\text{C}$ 結合および $\text{C}-\text{O}$ 結合($1000 \sim 1200\text{cm}^{-1}$)、 $\text{Si}-\text{H}$ 結合(2120cm^{-1})等がある。これらの吸収ピーク面積を、 $\text{Si}-\text{O}$ 結合(1110cm^{-1})のピーク面積で規格化したところ、 Na^+ がアモルファス炭素の生成に顕著な効果を及ぼしていることがわかった。

【0040】また、 $\text{C}=\text{O}$ 結合(1700cm^{-1})、 $\text{C}=\text{C}$ 結合(1600cm^{-1})、 $\text{N}-\text{H}$ 結合(1535cm^{-1})の分解率を調べるために、これらの各吸収ピーク面積を $\text{Si}-\text{O}$ 結合(1110cm^{-1})のピーク面積で規格化したところ、これら3種類のイオンの中では Kr^+ の効果が最大であった。

【0041】さらに、上記サンプルのラマン散乱スペクトルを行った結果を図8に示す。この結果は、先の図4に示したPS製シャーレについての結果とほぼ同様であった。このことから、PSもSPUも、イオン注入により生ずる炭素構造はほぼ同じであることが示唆された。

【0042】実験例5

本実験例では、SPUシャーレの底面に0.01mm径の円形パターンを多数開口したメッシュ状のアルミニウム・マスクを介して Na^+ をドーズ量 1×10^{15} 個/ cm^2 にてイオン注入し、このシャーレ上で細胞を培養し

た。7日後の状態を顕微鏡観察にもとづいて一部スケッチした図を図9に示す。図中、前述の図6と共通部分については同一符号を付してある。本実験においても、イオン未照射面11上では細胞3の接着がほとんどみられないのに対し、イオン照射面12a上では全面に細胞3が接着していた。これは、SPUを用いた場合、選択的なイオン注入により細胞接着性の2次元的制御が可能であることを示している。

【0043】

【発明の効果】以上の説明からも明らかなように、本願の第1の発明にかかる細胞接着性材料は、従来の材料に比べて細胞接着性が改善されるか、もしくは新たに付与されたものである。この細胞接着性の改善もしくは付与は、高分子材料の表面の化学構造の変化を直接に反映したものであるため、コラーゲン等の接着性タンパク質をコーティングする工程も不要である。上述の実験例の成果を直ちに活かせる用途としては、細胞培養用シャーレが有望である。この他、血管内皮細胞の接着によるハイブリッド型人工血管、皮膚細胞の接着による人工皮膚等の様々な医療用材料を開発する下地を提供する観点からも、本発明の産業上の価値は極めて大きい。

【0044】また、本願の第2の発明にかかる細胞接着性材料の製造方法は、上記の表面改質を極めて制御性、再現性に優れるイオン注入により行うものである。本発明も、上記細胞接着性材料の実用的な供給手段として同様に大きな産業上の価値を有するものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】 Na^+ 照射後のPS製シャーレ上でウシ血管内皮細胞を培養した場合の細胞数の経日変化を、未照射のPS製シャーレと比較しながら示すグラフである。

【図2】円形パターンに N_2^+ を照射したPS製シャーレ上における細胞の接着状態を顕微鏡観察にもとづいて示す模式的平面図であり、(a)はPS製シャーレの全体像、(b)はその一部を拡大したものである。

【図3】各種イオンを注入したPS製シャーレの赤外線吸収スペクトル図である。

【図4】各種イオンを注入したPS製シャーレのラマン散乱スペクトル図である。

【図5】メッシュ状パターンに N^+ を照射したPS製シャーレ上における細胞の接着状態を顕微鏡観察にもとづいて示す模式的平面図である。

【図6】円形パターンに Na^+ を照射したSPUシャーレ上における細胞の接着状態を顕微鏡観察にもとづいて示す模式的平面図であり、(a)はSPUシャーレの全体像、(b)はその一部を拡大したものである。

【図7】各種イオンを注入したSPUシャーレの赤外線吸収スペクトル図である。

【図8】各種イオンを注入したSPUシャーレのラマン散乱スペクトル図である。

【図9】メッシュ状パターンに Na^+ を照射したSPU

シャーレ上における細胞の接着状態を顕微鏡観察にもとづいて示す模式的平面図である。

【符号の説明】

1 . . . イオン未照射面 (P S)

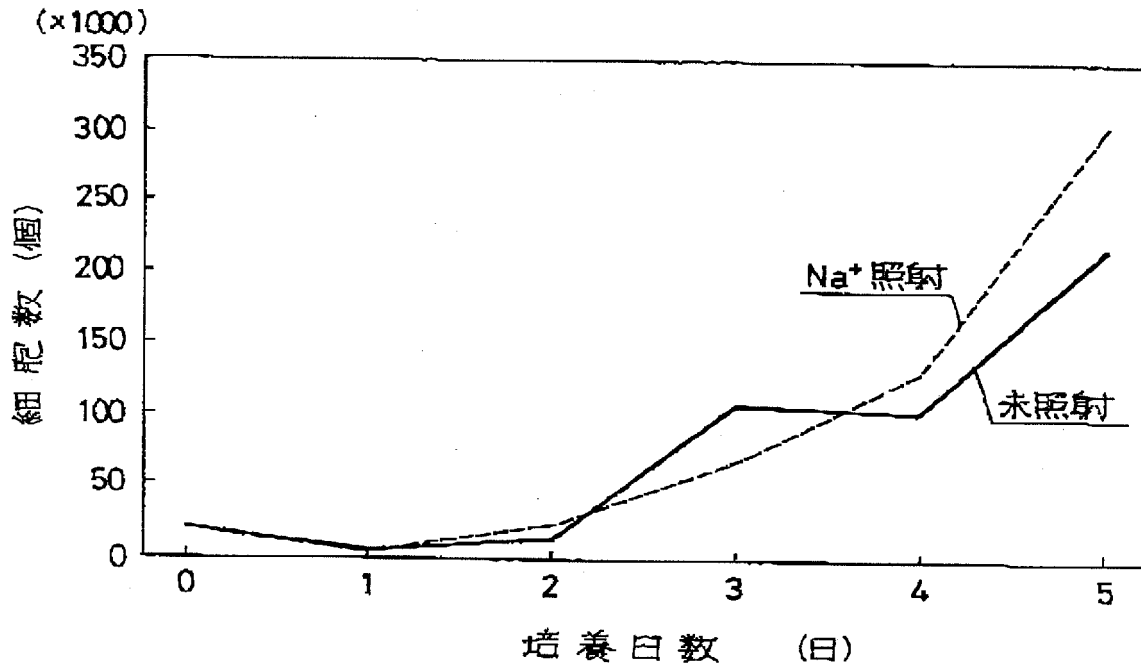
2, 2 a . . . イオン照射面

3 . . . 細胞

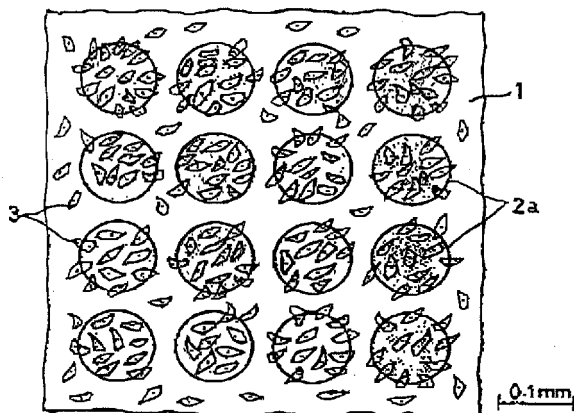
1 1 . . . イオン未照射面 (S P U)

1 2, 1 2 a . . . イオン照射面

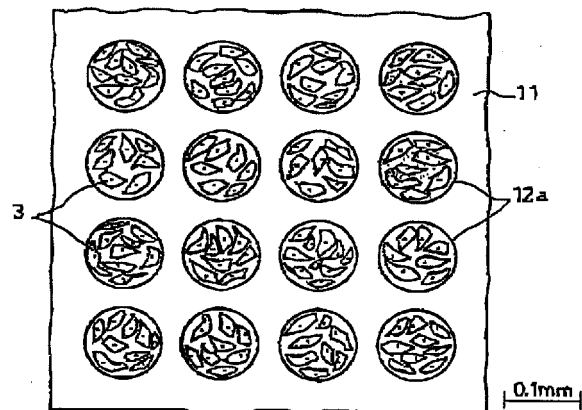
【図1】



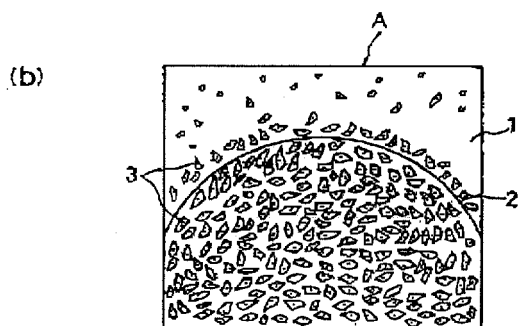
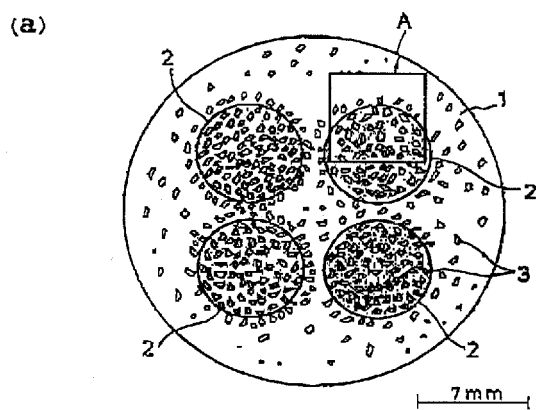
【図5】



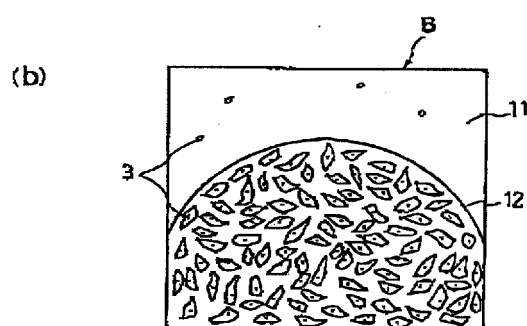
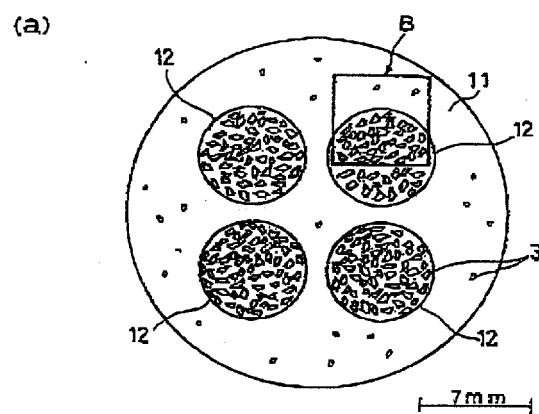
【図9】



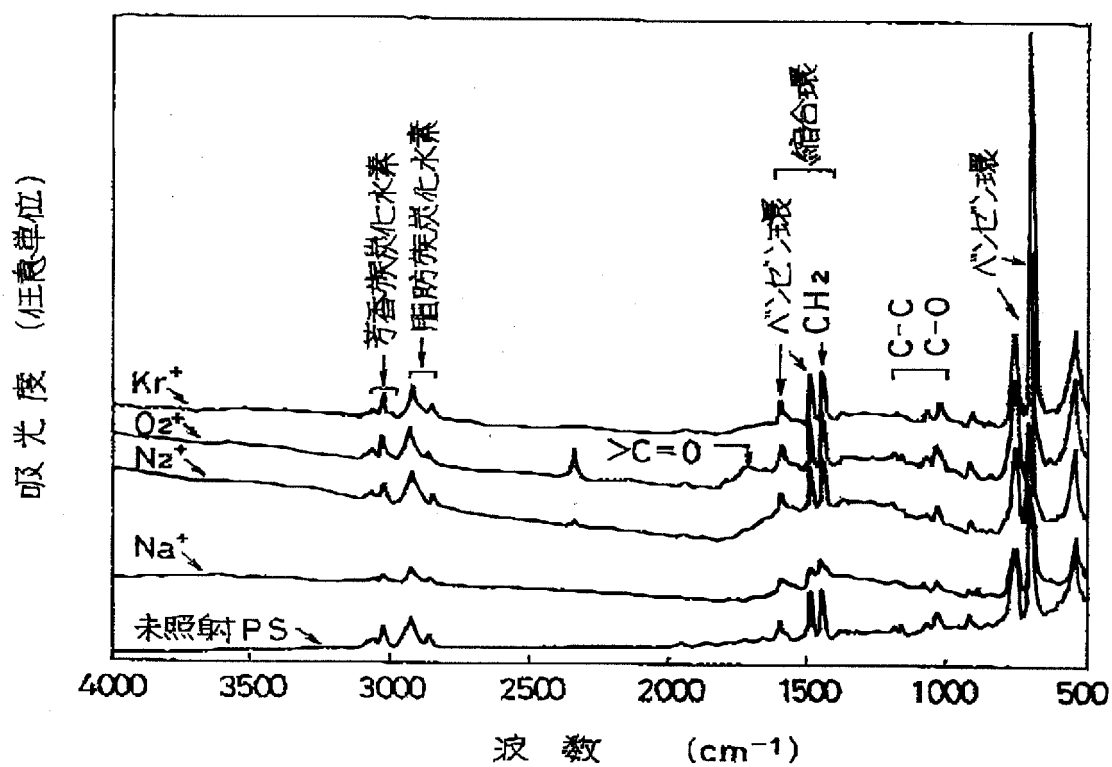
【図2】



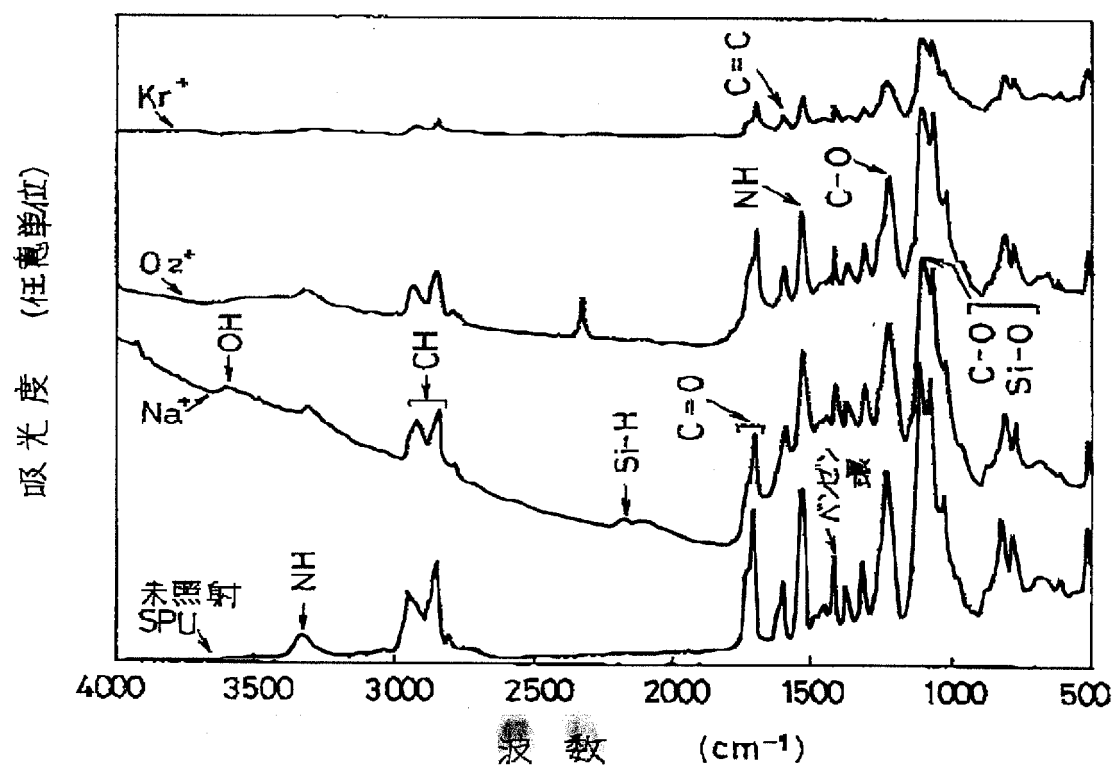
【図6】



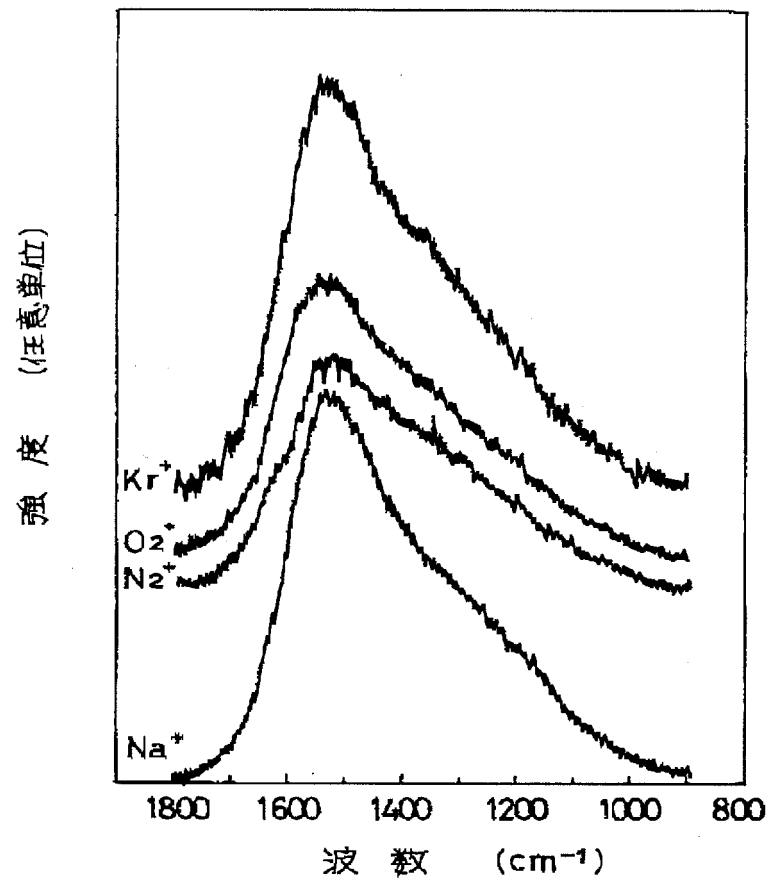
【図3】



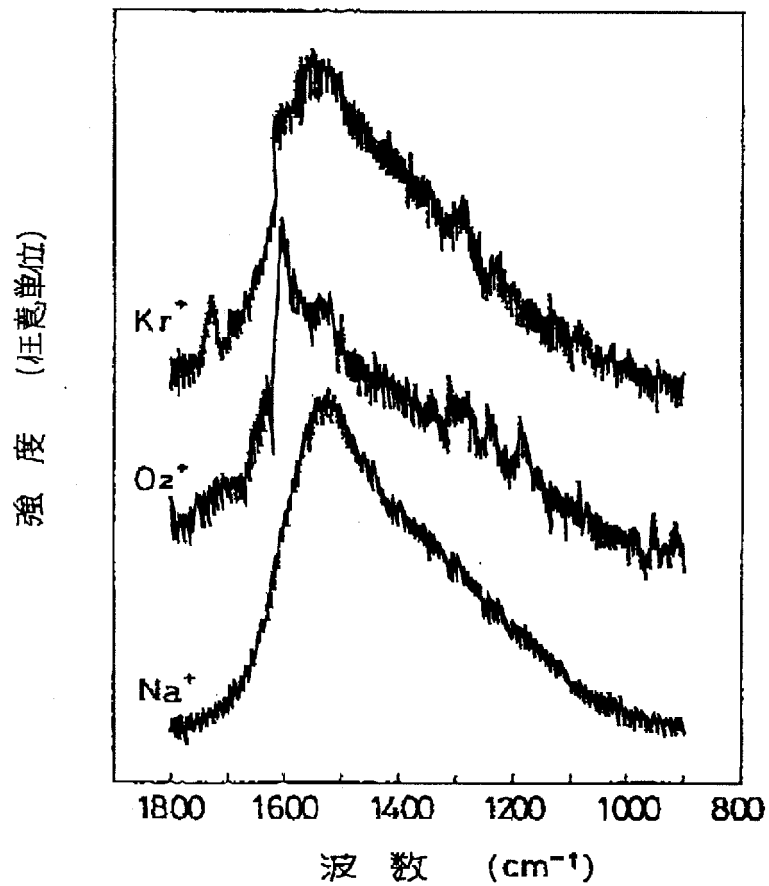
【図7】



【図4】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 季 載錫
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(72)発明者 貝原 真
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(72)発明者 岩木 正哉
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内

(72)発明者 雀部 博之
埼玉県和光市広沢2番1号 理化学研究所
内